

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

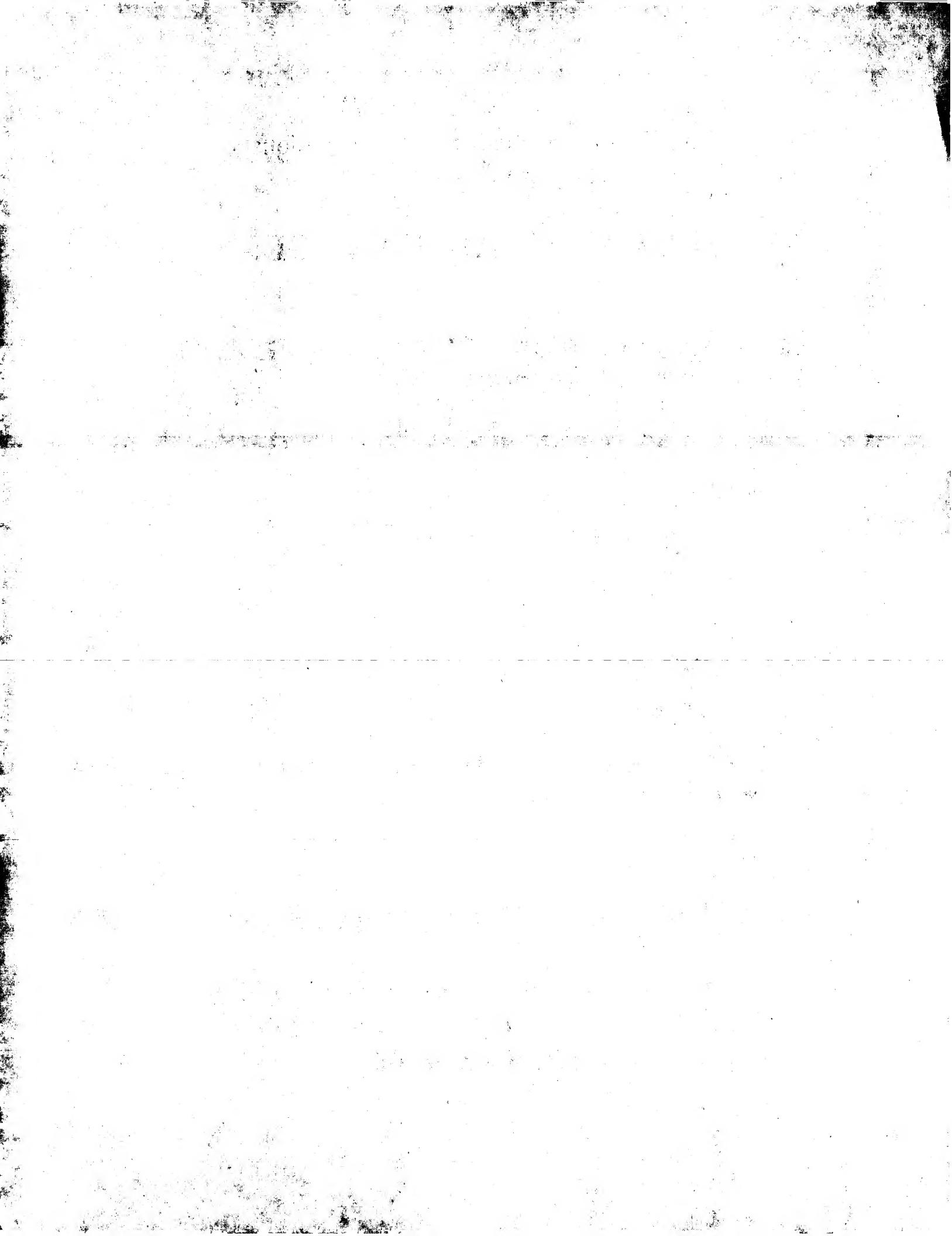
Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



日本国特許庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

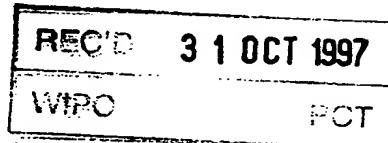
12.09.97

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1996年 8月19日



出願番号  
Application Number:

平成 8年特許願第235928号

出願人  
Applicant(s):

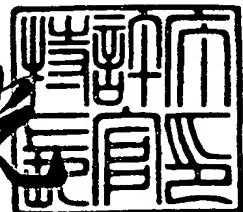
雪印乳業株式会社

**PRIORITY DOCUMENT**

1997年10月17日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

荒井 寿光



【書類名】 特許願  
【整理番号】 SNMFP96311  
【提出日】 平成 8年 8月19日  
【あて先】 特許庁長官 荒井 寿光 殿  
【発明の名称】 新規DNA及びそれを用いた蛋白質の製造方法  
【請求項の数】 2  
【発明者】  
【住所又は居所】 栃木県下都賀郡石橋町石橋 578-15 西浦ハイツ2  
-4  
【氏名】 中川 信明  
【発明者】  
【住所又は居所】 栃木県河内郡南河内町緑2-3293-46  
【氏名】 保田 尚孝  
【発明者】  
【住所又は居所】 栃木県下都賀郡壬生町幸町3-11-12  
【氏名】 森永 伴法  
【特許出願人】  
【識別番号】 000006699  
【氏名又は名称】 雪印乳業株式会社  
【代表者】 片山 純男  
【代理人】  
【識別番号】 100090941  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 藤野 清也  
【電話番号】 3226-6671  
【代理人】  
【識別番号】 100105061  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 児玉 喜博

【電話番号】 3226-6671

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 014834

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 原寄託についての受託書 1

【包括委任状番号】 9406430

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規DNA及びそれを用いた蛋白質の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表配列番号1及び2の塩基配列を含むDNA。

【請求項2】 配列表配列番号1及び2の塩基配列を含むDNAを発現ベクターに挿入して次の物理化学的性質をもち、破骨細胞の分化及び／又は成熟抑制活性のある蛋白質を発現することのできるベクターを作成し、これを用いて遺伝子工学的手法により該蛋白質を製造することを特徴とする。次の物理化学的性質をもち、破骨細胞の分化及び／又は成熟抑制活性のある蛋白質の製造法。

(a) 分子量 (SDS-PAGEによる);

(i) 還元条件下で約60kD

(ii) 非還元条件下で約60kD及び約120kD

(b) アミノ酸配列;

配列表配列番号3のアミノ酸配列を有する。

(c) 親和性;

陽イオン交換体及びヘパリンに親和性を有する。

(d) 熱安定性;

(i) 70°C、10分間または56°C、30分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が低下する。

(ii) 90°C、10分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が失われる。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規なDNA、及びそれを用いて遺伝子工学的手法により破骨細胞の分化及び／又は成熟抑制活性（以下、破骨細胞形成抑制活性という）を有する蛋白質を製造する方法に関する。詳しくは、破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質OCIFをコードするゲノムDNA、及びこのゲノムDNAを用いて遺伝子工学的手法により該蛋白質を製造する方法に関する。

## 【0002】

## 【従来の技術】

人の骨は絶えず吸収と再形成を繰り返しているが、この過程で中心的な働きをしている細胞が、骨形成を担当する骨芽細胞と骨吸収を担当する破骨細胞である。これらの細胞が担当している骨代謝の異常により発生する疾患の代表として骨粗鬆症が挙げられる。この疾患は骨芽細胞による骨形成を破骨細胞による骨吸収が上回ることにより発生する疾患である。この疾患の発生メカニズムについては未だ完全には解明されていないが、この疾患は骨の疼痛を発生し、骨の脆弱化による骨折の原因となる疾患である。高齢人口の増加に伴い、骨折による寝たきり老人の発生の原因となるこの疾患は社会問題にもなっており、その治療薬の開発が急務となっている。このような骨代謝異常による骨量減少症は骨吸収の抑制、骨形成の促進、或いはこれらのバランスの改善により治療することが期待される。

## 【0003】

骨形成は、骨形成を担当する細胞の増殖、分化、活性化を促進すること、或いは骨吸収を担当する細胞の増殖、分化、活性化を抑制することにより促進することが期待される。近年、このような活性を有する生理活性蛋白質（サイトカイン）への関心が高まり、精力的な研究が行われている。骨芽細胞の増殖或いは分化を促進するサイトカインとして、線維芽細胞増殖因子ファミリー（fibroblast growth factor； FGF : Rodan S.B. et al., Endocrinology vol. 121, p1917, 1987）、インシュリン様増殖因子-I（insulin like growth factor-I ; IGF-I : Hock J. M. et al., Endocrinology vol. 122, p254, 1988）、インシュリン様増殖因子-II（IGF-II: McCarthy T. et al., Endocrinology vol.124, p301, 1989）、アクチビンA（Activin A ; Centrella M. et al., Mol. Cell. Biol. vol. 11, p250, 1991）、トランスフォーミング増殖因子- $\beta$ （transforming growth factor- $\beta$  ; Noda M., The Bone, vol. 2, p29, 1988）、バスキュロトロビン（Vasculotropin ; Varonique M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. vol. 199, p380, 1994）、及び異所骨形成因子ファミリー（bone morphogenic protein ; BMP : BMP-2 ; Yamaguchi, A et al., J. Cell Biol. vol. 113, p682,

1991, OP-1 ; Sampath T. K. et al., J. Biol. Chem. vol. 267, p20532, 1992, Knutsen R. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. vol. 194, p1352, 1993)等のサイトカインが報告されている。

【0004】

一方、破骨細胞形成、即ち破骨細胞形成の分化及び／又は成熟を抑制するサイトカインとしては、トランスフォーミング増殖因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$  ; Chenu C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 85, p5683, 1988) やインターロイキン-4 (interleukin-4 ; Kasano K. et al., Bone-Miner., vol. 21, p179, 1993) 等が報告されている。又、破骨細胞による骨吸収を抑制するサイトカインとしては、カルシトニン(calcitonin ; Bone-Miner., vol. 17, p347, 1992) 、マクロファージコロニー刺激因子(macrophage colony-stimulating factor; Hattersley G. et al. J. Cell. Physiol. vol. 137, p199, 1988) 、インターロイキン-4(Watanabe, K. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. vol. 172, p1035, 1990)、及びインターフェロン- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ ; Gowen M. et al., J. Bone Miner. Res., vol. 1, p469, 1986) 等が報告されている。

【0005】

これらのサイトカインは、骨形成の促進や骨吸収の抑制による骨量減少症の改善剤となることが期待され、インシュリン様増殖因子-I や異所骨形成因子ファミリーのサイトカイン等、上記のサイトカインの一部については骨代謝改善剤として臨床試験が実施されている。又、カルシトニンは、骨粗鬆症の治療薬、疼痛軽減薬として既に市販されている。又、現在、骨に関わる疾患の治療及び治療期間の短縮を図る医薬品として、臨床では活性型ビタミンD<sub>3</sub>、カルシトニン及びその誘導体、エストラジオール等のホルモン製剤、イブリフラボン又はカルシウム製剤等が使用されている。しかし、これらを用いた治療法はその効果並びに治療結果において必ずしも満足できるものではなく、これらに代わる新しい治療薬の開発が望まれていた。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明者らは、このような状況に鑑み銳意探索の結果、既にヒト胎児肺線維芽

細胞IMR-90(ATCC寄託-受託番号CCL186)の培養液に破骨細胞形成抑制活性、即ち破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質OCIFを見出している(PCT/JP96/00374号)。この破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質OCIFの由来について、さらに鋭意探索したところ、ヒト由来OCIFのゲノムDNAの塩基配列を決定するに至った。即ち、本発明は破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質OCIFをコードするゲノムDNA、及びそれを用いて遺伝子工学的手法により該蛋白質を製造する方法を提供することを課題とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明は、破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質OCIFをコードするゲノムDNA、及びそれを用いて遺伝子工学的手法により該蛋白質を製造する方法に関する。本発明のDNAは、配列表配列番号1及び2の塩基配列を含む。

また、本発明は、配列表配列番号1及び2の塩基配列を含むDNAを発現ベクターに挿入して次の物理化学的性質をもち、破骨細胞の分化及び/又は成熟抑制活性のある蛋白質を発現することのできるベクターを作成し、これを用いて遺伝子工学的手法により該蛋白質を製造する方法に関する。

(a) 分子量( SDS-PAGE による) :

- (i) 還元条件下で約60kD
- (ii) 非還元条件下で約60kD及び約120kD

(b) アミノ酸配列:

配列表配列番号3のアミノ酸配列を有する。

(c) 親和性:

陽イオン交換体及びヘパリンに親和性を有する。

(d) 熱安定性:

- (i) 70°C、10分間または56°C、30分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が低下する。
- (ii) 90°C、10分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が失われる。

本発明の遺伝子を発現させることにより得られる蛋白質は、破骨細胞形成抑制

活性を有し、骨粗鬆症などの骨量減少症、リウマチ又は変形性関節症などの骨代謝異常疾患、あるいは多発性骨髄腫などの骨代謝異常疾患の治療及び改善を目的とした医薬組成物として、あるいはこのような疾患の免疫学的診断を確立するための抗原として有用である。

## 【0008】

## 【発明の実施の形態】

本発明の破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質OCIFをコードするゲノムDNAは、ヒト胎盤ゲノムDNAとコスミドベクターを用いてコスミドライブライアリを作製し、このライブライアリをOCIF c DNAをもとに作製したDNA断片をプローブとしてスクリーニングすることにより得られる。このようにして得られたゲノムDNAを適当な発現ベクターに挿入してOCIF発現コスミドを作製し、常法により各種の細胞及び菌株などの宿主にトランスフェクトして発現させることにより、組み換え型OCIFを製造することができる。得られた破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質（破骨細胞形成抑制因子）は、骨粗鬆症等の骨量減少症或いはその他の骨代謝異常疾患の治療及び改善を目的とした医薬組成物として、或いはこのような疾患の免疫学的診断を確立するための抗原として有用である。本発明の蛋白質は、製剤化して経口或いは非経口的に投与することができる。即ち、本発明の蛋白質を含む製剤は、破骨細胞形成抑制因子を有効活性成分として含む医薬組成物としてヒト及び動物に対して安全に投与されるものである。医薬組成物の形態としては、注射用組成物、点滴用組成物、坐剤、経鼻剤、舌下剤、経皮吸収剤等が挙げられる。注射用組成物の場合は、本発明の破骨細胞形成抑制因子の薬理的有效量及び製薬学的に許容しうる担体の混合物であり、その中にはアミノ酸、糖類、セルロース誘導体、及びその他の有機／無機化合物等の一般的に注射用組成物に添加される賦形剤／賦活剤を用いることもできる。又、本発明の破骨細胞形成抑制因子とこれらの賦形剤／賦活剤を用い注射剤を調製する場合は、必要に応じてpH調整剤、緩衝剤、安定化剤、可溶化剤等を添加して常法によって各種注射剤とすることができます。

## 【0009】

以下に実施例を挙げて本発明をより詳細に説明するが、これらは単に例示する

のみであり、本発明はこれらにより限定されるものではない。

## 【0010】

## 【実施例1】

コスミドライブラーの作製

ヒト胎盤ゲノムDNA(クローンテック社; Cat.No.6550-2)とpWE15 コスミドベクター(ストラタジーン社)を用いてコスミドライブラーを作製した。基本的には、ストラタジーン社のpWE15 コスミドベクターキットに添付されたプロトコードに従って実施したが、DNA、大腸菌、ファージを扱う一般的方法は、Molecular Cloning : A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory(1989))を参考に従った。

## 【0011】

(i) ヒト・ゲノムDNA 制限酵素分解物の調製

1.5ml のエッペンドルフチューブ4本(チューブA、B、C、D)に10mM Tris-HCl、10mM MgCl<sub>2</sub>、100mM NaClを含む溶液 750μl に溶かしたヒト胎盤ゲノムDNAをそれぞれ 100μg 入れ、チューブAには 0.2ユニット、チューブBには 0.4ユニット、チューブCには 0.6ユニット、チューブDには 0.8ユニットの制限酵素MboIを添加して1時間消化した。その後、それぞれのチューブに20mMになるようにEDTAを添加して反応を止め、フェノール／クロロホルム(1:1)で抽出し、水相に2倍量のエタノールを加えてDNAを沈殿させた。遠心分離でDNAを回収したあと、70%エタノールで洗い、それぞれのチューブの中のDNAを 100μl のTEに溶解した。4本のチューブのDNAを1本にまとめ、68℃にて10分保温したのち室温に戻し、これを遠心管(38ml)の中で作製した10%—40%直線状ショ糖密度勾配に重層した。ショ糖密度勾配は20mM Tris-HCl(pH8.0)、5mM EDTA、1M NaClを含む緩衝液のなかで作製した。この遠心管を日立製作所SRP28SAローターを用いて20℃で26,000rpmにて24時間遠心したのち、フラションコレクターを用いてショ糖密度勾配を0.4mlずつのフラクションに分画した。各フラクションの一部を0.4%アガロース電気泳動にかけてDNAのサイズを確認したのち、およそ30kb(キロベースペア)から40kbの長さのDNAを含むフラクションを集め、糖濃度を10%以下になるようTEで希釈したのちエタノールを2.5倍量加えてDN

Aを沈殿させた。DNAはTE(10mM HCl(pH8.0)+1mM EDTA緩衝液(以下TEという))に溶解したのち4℃で保存した。

【0012】

(ii) コスミド・ベクターの準備

ストラタジーン社のpWE15コスミドベクターをコスミドベクターキットに添付されたプロトコールに従って制限酵素BamHIによって完全消化したのち、エタノール沈殿によってDNAを回収し、1mg/mlの濃度になるようTEに溶解した。このDNAの5'末端のリン酸を子牛小腸アルカリ性 fosfataze を用いて除いた後、フェノール抽出とエタノール沈殿によってDNAを回収し、1mg/mlの濃度になるようTEに溶解した。

【0013】

(iii) ゲノムDNAのベクターへのライゲーション及びin vitroパッケージング

1.5μgのサイズ分画したゲノムDNAと3μgの制限酵素BamHIで消化したpWE15コスミドベクターをファルマシア社のReady-To-Go T4DNAライゲースを用いて20μlの反応溶液中でライゲーションした。ライゲーションしたDNAを、ギガパックIIパッケージングエクストラクト(ストラタジーン社)を用い、プロトコールに従ってin vitroパッケージングした。パッケージング反応後、反応液の一部をSM緩衝液で段階的に希釈し、10mM MgCl<sub>2</sub>に懸濁した大腸菌XL1-Blue MR(ストラタジーン社)と混合してファージを感染させたのち、50μg/mlのアンピシリンを含むLBアガーブレートに蒔き、生ずるコロニーの数を計数した。この結果を基にパッケージング反応液1μl当たりのコロニー数を算出した。

【0014】

(iv) コスミドライブラーの作製

上記の方法で作製したパッケージング反応液と大腸菌XL1-Blue MRを混合し、直径15cmのアガロースプレート当たり50,000個のコロニーが生ずるようにアンピシリンを含むアガロースプレートに蒔いた。一夜37℃でプレートを保温したのち、プレート一枚当たり3mlのLB培地を加えて大腸菌のコロニーを懸濁し、回収した。アガロースプレートをさらに3mlのLB培地で1回洗い、これを基の大腸菌懸濁液と合わせた。すべてのアガロースプレートから回収した大腸菌を一本の遠心

管にまとめ、グリセロールを20%となるように添加し、さらにアンピシリンを50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように加えた。十分混合したのち一部を分取し、残りを-80°Cに保存した。分取した大腸菌を段階希釈してアガーブレートに蒔き、1ml当たりのコロニー数を算出した。

## 【0015】

## 【実施例2】

コスミドライブラーのスクリーニングとコロニーの純化

50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含む直径15cmのLBアガロースプレートに直径14.2cm のニトロセルロースフィルター（ミリポア社）を乗せ、その上にプレート一枚当たり50,000個の大腸菌コロニーが生ずるようにコスミドライブラーを蒔き、37°Cにて一夜保温した。常法に従ってニトロセルロースフィルター上の大腸菌を別のニトロセルロースフィルターに転写してレプリカフィルターを2枚作製した。コスミドベクターキットに添付されたプロトコールに従い、レプリカフィルター上の大腸菌をアルカリ変成、中和し、ストラタリンカー（ストラタジーン社）を用いてDNAをニトロセルロースフィルター上に固定した。さらにこのフィルターを減圧オーブン中で80°Cで2時間加熱した。このように処理したニトロセルロースフィルターを、ヒトOCIFcDNAの5'末端と3'末端から作製した2種のDNAをプローブとしてハイブリダイズした。即ち、OCIFcDNAを含む大腸菌 pBK/OIFI0（通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所寄託、受託番号FERM BP-5267）よりプラスミドを精製し、OCIFcDNAを含むプラスミドを制限酵素KpnIとEcoRIで消化し、生ずるフラグメントをアガロースゲルを用いて分離したのち、0.2kbのKpnI/EcoRIフラグメントをQIAEX IIゲルエクストラクションキット（キヤゲン社）を用いて精製した。このDNAをメガプライムDNAラベリングシステム（アマシャム社製）を用いて<sup>32</sup>Pで標識した（5'-DNAプローブ）。また別に、得られたプラスミドを制限酵素BamHIと制限酵素EcoRVで消化して生ずる0.2kbのBamHI/EcoRVフラグメントを同様に精製し、上記の方法で<sup>32</sup>P標識した（3'-DNAプローブ）。上記レプリカフィルターのうち一枚を5'-DNAプローブと、別一枚を3'-DNAプローブとハイブリダイズした。コロニー-ハイブリダイゼーション及びフィルターの洗浄はコスミドベクターキットに添付されたプロトコールに述べられた方法に従つ

て行った。オートラジオグラフィーの結果それぞれのプローブで複数個の陽性シグナルが検出されたが、両方のプローブにハイブリダイズする陽性シグナルが一個検出された。このシグナルに相当するアガロースプレート上のコロニーを精製することにより純化したコロニーを単離した。純化されたコロニーから常法に従ってコスミドを精製し pWEOCIF と命名した。このコスミドに含まれるヒトゲノムDNA のサイズはおよそ38kbであった。

## 【0016】

## 【実施例3】

ヒトOCIFゲノムDNA の塩基配列の決定

## (i) OCIF ゲノムDNA のサブクローニング

コスミド pWEOCIF を制限酵素 EcoRI を用いて消化し、生じたフラグメントを 0.7% アガロースゲルに供与して分離したのち、サザンプロット法によってDNA をナイロン膜 (Hybond-N、アマシャム社) に移し、ストラタリンカー (ストラタジーン社) を用いてDNA をナイロン膜に固定した。一方、プラスミド pBKOCIF を制限酵素 EcoRI によって消化し、ヒトOCIFcDNAを含む1.6kb のフラグメントをアガロースゲルを用いて単離したのち、メガプライムDNA ラベリングシステム (アマシャム社) を用いて<sup>32</sup>P 標識した。常法に従って上記ナイロン膜と<sup>32</sup>P 標識した 1.6kb のOCIFcDNAをハイブリダイズさせた結果、6kb、4kb、3.6kb、2.6kb のDNA フラグメントがハイブリダイズすることがわかった。ヒトOCIFcDNAとハイブリダイズするこれらのフラグメントをアガロースゲルを用いて単離したのち、それぞれ pBluescript II SK+ベクター (ストラタジーン社) のEcoRI サイトに常法に従ってサブクローニングし、得られたプラスミドをそれぞれ pBSE6、pBSE4、pBSE3.6、pBSE2.6 と命名した。

## 【0017】

## (ii) 塩基配列の決定

上記プラスミドにサブクローニングされたヒトOCIFゲノムDNA の塩基配列の決定には ABI ダイデオキシターミネーターサイクルシークエンシングレディーリアクションキット (パーキンエルマー社) と 373 シークエンシングシステム (アプライドバイオシステムズ社) を使用した。塩基配列決定用プライマーはヒトOCIF

cDNAの塩基配列（配列表配列番号4）をもとに合成した。また、塩基配列が決定された部分をもとにしてさらにプライマーを合成した。決定された塩基配列を配列表配列番号1及び2に示す。配列番号1にはOCIF遺伝子の第1エクソンが含まれ、配列番号2には第2、第3、第4、第5エクソンが含まれる。第1エクソンと第2エクソンの間にはおよそ17kbのヌクレオチドが介在する。

## 【0018】

## 【実施例3】

COS-7細胞による組み換え型OCIFの生産

## (i) OCIFゲノムDNA発現コスミドの作製

OCIFゲノムDNAを動物細胞で発現させるために、コスミドベクターpWE15(ストラータジーン社)に発現プラスミドpcDL-SR $\alpha$ 296(Molecular and Cellar Biology, vol.8, p466-472, 1988)の発現ユニットを挿入した。まず、発現プラスミドpcDL-SR $\alpha$ 296を制限酵素SalIで消化してSR $\alpha$ プロモーター、SV40後期スライス信号、ポリ(A)付加信号などを含む約1.7kbの発現ユニットを切り出し、アガロース電気泳動によって分離後、QIAEX IIゲルエクストラクションキット(キアゲン社)を用いて精製した。一方、コスミドベクターpWE15を制限酵素EcoRIで消化し、アガロース電気泳動によって分離後、8.2kbのpWE15 DNAをQIAEX IIゲルエクストラクションキット(キアゲン社)を用いて精製した。これら二つのDNA断片末端をDNAブランディングキット(宝酒造社)を用いて平滑化し、DNAライゲーションキット(宝酒造社)を用いて結合させ、大腸菌DH5 $\alpha$ (ギブコBRL社)に導入した。得られた形質転換株を増殖させ、発現ユニットを含む発現コスミドpWESR $\alpha$ をキアゲンカラム(キアゲン社)を用いて精製した。

## 【0019】

前記(i)で得られた約38kbのOCIFゲノムDNAが挿入されたコスミドpWE0CIFを制限酵素NotIで消化して約38kbのOCIFゲノムDNAを切り出し、アガロース電気泳動によって分離後、QIAEX IIゲルエクストラクションキット(キアゲン社)を用いて精製した。一方、発現コスミドpWESR $\alpha$ を制限酵素EcoRIで消化し、フェノール、クロロホルムで抽出した後、エタノール沈殿し、TEに溶解した。この制限酵素EcoRIで消化されたpWESR $\alpha$ とEcoRI-XbaI-NotIアダプター(#1105、#1

156 ; ニューアイオニアンドバイオラボ社) をT4 DNAリガーゼ(宝酒造社)を用いて結合し、アガロース電気泳動によってフリーのアダプターと分離後、QIAEX II ゲルエクストラクションキット(キヤゲン社)を用いて精製した。制限酵素NotIで消化された約37kbのOCIFゲノムDNAとアダプターを付加したpWESR  $\alpha$ をT4 DNAリガーゼ(宝酒造社)を用いて結合し、ギガパックIIパッケイジングエクストラクト(ストラータジーン社)を用いてインヴィトロパッケイジングを行い、大腸菌XL1-Blue MR(ストラータジーン社)に感染させた。得られた形質転換株を増殖させ、OCIFゲノムDNAが挿入された発現コスミドpWESR  $\alpha$  OCIFをキヤゲンカラム(キヤゲン社)を用いて精製した。OCIF発現コスミドpWESR  $\alpha$  OCIFをエタノールによって沈澱させた後、無菌蒸留水に溶解し以下の操作に用いた。

## 【0020】

(ii)OCIFゲノムDNAのトランジェントな発現及びOCIF活性の測定

前記(i)で得られたOCIF発現コスミドpWESR  $\alpha$  OCIFを用いて、以下に述べる方法で組み換え型OCIFを発現させ、その活性を測定した。 $8 \times 10^5$  個のCOS-7細胞(理化学研究所細胞開発銀行、RCB0539)を6ウェルプレートの各ウェルに10%牛胎児血清(ギブコBRL社)を含むDMEM培地(ギブコBRL社)を用いて植え込み、翌日、培地を除いた後、無血清DMEM培地で細胞を洗浄した。トランスフェクション用試薬リポフェクタミン(ギブコBRL社)添付のプロトコールに従い、あらかじめOPTI-MEM培地(ギブコBRL社)を用いて希釀しておいたOCIF発現コスミドpWESR  $\alpha$  OCIFとリポフェクタミンを混合した後、この混合液を各ウェルの細胞に加えた。対照として発現コスミドpWESR  $\alpha$ を用い、細胞に同様に加えた。用いたコスミドDNA及びリポフェクタミンの量はそれぞれ3  $\mu$ g及び12  $\mu$ lであった。24時間後、培地を除き1.5mlの新しいEX-CELL301培地(JRHバイオサイエンス社)を加え、さらに48時間後、培地を回収し、これをOCIF活性測定用サンプルとした。OCIFの活性測定は久米川正好らの方法(蛋白質・核酸・酵素 Vol.34, p999 (1989))及びTakahashi N. et.alの方法(Endocrinology vol.122, p1373 (1988))に従い測定した。生後約17日のマウス骨髄細胞からの活性型ビタミンD<sub>3</sub>存在下での破骨細胞形成を酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性の誘導で試験し、その抑制活性を測定し、破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質(

OCIF) の活性とした。すなわち、96ウェルマイクロプレートの各ウエルに、 $2 \times 10^{-8}$ Mの活性型ビタミンD<sub>3</sub>と10%牛胎児血清を含むα-MEM培地(ギブコBRL社)で希釈したサンプル 100 μlを入れ、生後約17日のマウス骨髄細胞 $3 \times 10^5$ 個を 100 μl の10%牛胎児血清を含むα-MEM培地に懸濁させて播種し、5% CO<sub>2</sub>、37°C、湿度 100%にて一週間培養した。培養3日目と5日目に、培養液のうち 160 μl を廃棄し、 $1 \times 10^{-8}$ M活性型ビタミンD<sub>3</sub>及び10%牛胎児血清を含むα-MEM培地で希釈したサンプル 160 μl を添加した。培養7日後に細胞をリン酸塩緩衝生理食塩水で洗浄した後エタノール／アセトン(1:1)溶液で細胞を室温にて1分間固定し、破骨細胞形成を酸性ホスファターゼ活性測定キット(Acid Phosphatase, Leucocyte, Cat.No.387-A; シグマ社)を用いた染色で検出した。酒石酸存在下での酸性ホスファターゼ活性陽性細胞の減少をOCIF活性とした。結果を表1に示す。この結果より、IMR-90の培養液から得られた天然型OCIF及びCHO細胞で生産した組み換え型OCIFと同様の活性を、この培養液が有することが確認された。

## 【0021】

【表1】

## COS-7細胞で発現させた培養液中のOCIF活性

希釈率	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320
OCIF genomic DNA導入	++	++	++	++	+	-
ベクター導入	-	-	-	-	-	-
未処理	-	-	-	-	-	-

〔表中、++は破骨細胞形成が80%以上抑制される活性を、+は破骨細胞形成が30~80%抑制される活性を、-は活性が検出されないことを示す。〕

## 【0022】

(iii) ウエスタンプロッティングによる生産物の確認

上記(ii)で得られたOCIF活性測定用サンプルを $10\mu l$ 取り、 $10\mu l$ のSDS-PAGE用サンプルバッファー（0.5M Tris-HCl、20% グリセロール、4% SDS、 $20\mu g/ml$  ブロムフェノールブルー、pH 6.8）を加えて $100^{\circ}\text{C}$ で3分間煮沸したのち、非還元状態で10% SDSポリアクリルアミド電気泳動を行った。電気泳動後、セミドライプロッティング装置（バイオラッド社）を用いて蛋白質をゲルからPVDFメンブレン（ProBlott、パーキンエルマー社）にプロッティングした。そのメンブレンをプロッキング後、先に得られたOCIF蛋白質を西洋ワサビペーパーオキシダーゼで常法により標識した西洋ワサビペーパーオキシダーゼ標識抗OCIF抗体とともに $37^{\circ}\text{C}$ で2時間保温した。洗浄後、ECLシステム（アマシャム社）を用いて抗OCIF抗体が結合している蛋白質を検出した。図1に示すようにpWESR  $\alpha$  OCIFをトランスフェクトしたCOS-7細胞の培養上清からは、分子量約120キロダルトンと60キロダルトンの2本のバンドが検出された。一方、pWESR  $\alpha$  ベクターのみをトランスフェクトしたCOS-7細胞の培養上清を同様の方法で解析した結果、120キロダルトンと60キロダルトンのバンドは検出されなかった。この結果より、得られた蛋白質はOCIFであることが確認された。

## 【0023】

## 【発明の効果】

本発明によると破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質OCIFをコードするゲノムDNA、及びそれを用いて遺伝子工学的手法により該蛋白質を製造する方法が提供される。本発明の遺伝子を発現させることにより得られる蛋白質は、破骨細胞形成抑制活性を有し、骨粗鬆症などの骨量減少症、リウマチ又は変形性関節症などの骨代謝異常疾患、あるいは多発性骨髄腫などの骨代謝異常疾患の治療及び改善を目的とした医薬組成物として、あるいはこのような疾患の免疫学的診断を確立するための抗原として有用である。

【0024】

配列番号：1

配列の長さ：1316

配列の型：核酸

鎖の数：2

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA（ヒトOCIFゲノムDNA-1）

配列：

CTGGAGACAT ATAACCTGAA CACTTGGCCC TGATGGGAA GCAGCTCTGC AGGGACTTT 60  
 TCAGCCATCT GTAAACAATT TCAGTGGCAA CCCGCGAACT GTAATCCATG AATGGGACCA 120  
 CACTTTACAA GTCATCAAGT CTAACCTCTA GACCAGGGAA TTAATGGGGG AGACAGCGAA 180  
 CCCTAGAGCA AAGTGCCAAA CTTCTGTCGA TAGCTTGAGG CTAGTGGAAA GACCTCGAGG 240  
 AGGCTACTCC AGAACGTTTAG CGCGTAGGAA CCTCCGATAAC CAATAGCCCT TTGATGATGG 300  
 TGGGGTTGGT GAAGGGAACA GTGCTCCGCA AGGTTATCCC TGCCCCAGGC AGTCCAATT 360  
 TCACTCTGCA GATTCTCTCT GGCTCTAACT ACCCCAGATA ACAAGGAGTG AATGCAGAAT 420  
 AGCACGGGCT TTAGGGCCAA TCAGACATTA GTTAGAAAAA TTCCTACTAC ATGGTTTATG 480  
 TAAACTTGAA GATGAATGAT TCGGAACCTCC CCCAAAAGGG CTCAGACAAT GCCATGCATA 540  
 AAGAGGGGCC CTGTAATTG AGGTTTCAGA ACCCGAAGTG AAGGGGTAG GCAGCCGGT 600  
 ACGGCGGAAA CTCACAGCTT TCGCCCAGCG AGAGGACAAA GGTCTGGAC ACACCTAAC 660  
 TGCCTCCGGA TCTTGGCTGG ATCGGACTCT CAGGGTGGAG GAGACACAAG CACAGCAGCT 720  
 GCCCAGCGTG TGCCCAAGCCC TCCCACCGCT GGTCCCGGCT GCCAGGAGGC TGGCCGCTGG 780  
 CGGGAAAGGGG CCGGGAAACC TCAGAGCCCC GCGGAGACAG CAGCCGCCTT GTTCCCTCAGC 840  
 CCGGTGGCTT TTTTTCCCC TGCTCTCCCA GGGGACAGAC ACCACCGCCC CACCCCTCAC 900  
 GCCCCACCTC CCTGGGGGAT CCTTCCGCC CCAGCCCTGA AAGCGTTAAT CCTGGAGCTT 960  
 TCTGCACACC CCCCGACCGC TCCCGCCCAA GCTTCCTAAA AAAGAAAGGT GCAAAGTTG 1020  
 GTCCAGGATA GAAAAATGAC TGATCAAAGG CAGGCATAAC TTCCTGTTGC CGGGACGCTA 1080  
 TATATAACGT GATGAGCGCA CGGGCTGCGG AGACGCACCG GAGCGCTCGC CCAGCCGCCG 1140  
 CCTCCAAGCC CCTGAGGTTT CGGGGACCA CA ATG AAC AAG TTG CTG TGC TGC 1193

Met Asn Lys Leu Leu Cys Cys

-20 -15

GCG CTC GTG GTAAGTCCCT GGGCCAGCCG ACGGGTGCCC GGCGCCTGGG 1242  
 Ala Leu Val

GAGGCTGCTG CCACCTGGTC TCCCAACCTC CCAGCGGACC GGCGGGGAGA AGGCTCCACT 1302  
 CGCTCCCTCC CAGG 1316

## 【0025】

配列番号：2

配列の長さ：9898

配列の型：核酸

鎖の数：2

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA (ヒトOCIFゲノムDNA-2)

配列：

GCTTACTTTG TGCCAAATCT CATTAGGCTT AAGGTAATAAC AGGACTTTGA GTCAAATGAT 60  
 ACTGTTGCAC ATAAGAACAA ACCTATTTTC ATGCTAAGAT GATGCCACTG TGTTCCCTTC 120  
 TCCTTCTAG TTT CTG GAC ATC TCC ATT AAG TGG ACC ACC CAG GAA ACG TTT 171  
 Phe Leu Asp Ile Ser Ile Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe  
 -10 -5 1

CCT CCA AAG TAC CTT CAT TAT GAC GAA GAA ACC TCT CAT CAG CTG TTG 219  
 Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu  
 5 10 15

TGT GAC AAA TGT CCT CCT GGT ACC TAC CTA AAA CAA CAC TGT ACA GCA 267  
 Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala  
 20 25 30 35

AAG TGG AAG ACC GTG TGC GCC CCT TGC CCT GAC CAC TAC TAC ACA GAC		315
Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp		
40	45	50
AGC TGG CAC ACC AGT GAC GAG TGT CTA TAC TGC AGC CCC GTG TGC AAG		363
Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys		
55	60	65
GAG CTG CAG TAC GTC AAG CAG GAG TGC AAT CGC ACC CAC AAC CGC GTG		411
Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val		
70	75	80
TGC GAA TGC AAG GAA GGG CGC TAC CTT GAG ATA GAG TTC TGC TTG AAA		459
Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys		
85	90	95
CAT AGG AGC TGC CCT CCT GGA TTT GGA GTG GTG CAA GCT G GTACGTGTCA		509
His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala		
100	105	110
ATGTGCAGCA AAATTAATTA GGATCATGCA AAGTCAGATA GTTGTGACAG TTTAGGAGAA		569
CACTTTGTT CTGATGACAT TATAGGATAG CAAATTGCAA AGGTAATGAA ACCTGCCAGG		629
TAGGTACTAT GTGTCTGGAG TGCTTCCAAA GGACCATTGC TCAGAGGAAT ACTTTGCCAC		689
TACAGGGCAA TTTAATGACA AATCTCAAAT GCACCAAATT ATTCTCTCAT GAGATGCATG		749
ATGGTTTTT TTTTTTTTT TAAAGAAACA AACTCAAGTT GCACTATTGA TAGTTGATCT		809
ATACCTCTAT ATTCACCTTC AGCATGGACA CCTTCAAACG GCAGCACTTT TTGACAAACA		869
TCAGAAATGT TAATTATAC CAAGAGAGTA ATTATGCTCA TATTAATGAG ACTCTGGAGT		929
GCTAACATA AGCAGTTATA ATTAATTATG TAAAAAATGA GAATGGTGAG GGGATTGCA		989

TTTCATTATT AAAAACAAAGG CTAGTTCTTC CTTAGCATG GGAGCTGAGT GTTGGGAGG 1049  
 GTAAGGACTA TAGCAGAAC TCTTCAATGA GCTTATTCTT TATCTTAGAC AAAACAGATT 1109  
 GTCAAGCCAA GAGCAAGCAC TTGCCTATAA ACCAAGTGCT TTCTCTTTG CATTGAAAC 1169  
 AGCATTGGTC AGGGCTCATG TGTATTGAAT CTTTAAACC AGTAACCCAC GTTTTTTC 1229  
 TGCCACATT GCGAAGCTTC AGTGCAGCCT ATAACCTTTC ATAGCTTGAG AAAATTAAGA 1289  
 GTATCCACTT ACTTAGATGG AAGAAGTAAT CAGTATAGAT TCTGATGACT CAGTTGAAG 1349  
 CAGTGTCTCT CAACTGAAGC CCTGCTGATA TTTAAGAAA TATCTGGATT CCTAGGCTGG 1409  
 ACTCCTTTT GTGGCAGCT GTCCTGCGCA TTGTAGAATT TTGGCAGCAC CCCTGGACTC 1469  
 TAGCCACTAG ATACCAATAG CAGTCCTTCC CCCATGTGAC AGCCAAAAAT GTCTTCAGAC 1529  
 ACTGTCAAAT GTCGCCAGGT GGCAAAATCA CTCCTGGTTG AGAACAGGGT CATCAATGCT 1589  
 AAGTATCTGT AACTATTTA ACTCTAAAAA CTTGTGATAT ACAAAAGTCTA AATTATTAGA 1649  
 CGACCAATAC TTTAGGTTA AAGGCATACA AATGAAACAT TCAAAAATCA AAATCTATTC 1709  
 TGTTTCTCAA ATAGTGAATC TTATAAAATT AATCACAGAA GATGCAAATT GCATCAGAGT 1769  
 CCCTTAAAT TCCTCTCGT ATGAGTATTG GAGGGAGGAA TTGGTGATAG TTCCTACTTT 1829  
 CTATTGGATG GTACTTGAG ACTCAAAAGC TAAGCTAAGT TGTGTGTGTG TCAGGGTGC 1889  
 GGGTGTGGAA TCCCATCAGA TAAAAGCAAA TCCATGTAAT TCATTCAGTA AGTTGTATAT 1949  
 GTAGAAAAAT GAAAAGTGGG CTATGCAGCT TGGAAACTAG AGAATTGAA AAAATAATGG 2009  
 AAATCACAAG GATCTTCTT AAATAAGTAA GAAAATCTGT TTGTAGAATG AAGCAAGCAG 2069  
 GCAGCCAGAA GACTCAGAAC AAAAGTACAC ATTTTACTCT GTGTACACTG GCAGCACAGT 2129  
 GGGATTTATT TACCTCTCCC TCCCTAAAAA CCCACACAGC GGTCCTCTT GGGAAATAAG 2189  
 AGGTTCCAG CCCAAAGAGA AGGAAAGACT ATGTGGTGT ACTCTAAAAA GTATTTAATA 2249  
 ACCGTTTGT TGTTGCTGTT GCTGTTTGA AATCAGATTG TCTCCTCTCC ATATTTTATT 2309  
 TACTTCATTG TGTTAATTCC TGTGGAATTA CTTAGAGCAA GCATGGTGA TTCTCAACTG 2369  
 TAAAGCCAAA TTTCTCCATC ATTATAATT CACATTTGC CTGGCAGGTT ATAATTTTA 2429  
 TATTTCCACT GATAGTAATA AGGTAAAATC ATTACTTAGA TGGATAGATC TTTTCATAA 2489  
 AAAGTACCAT CAGTTATAGA GGGAAAGTCAT GTTCATGTT AGGAAGGTCA TTAGATAAAG 2549  
 CTTCTGAATA TATTATGAAA CATTAGTTCT GTCATTCTTA GATTCTTTT GTAAATAAC 2609  
 TTTAAAGCT AACTTACCTA AAAGAAATAT CTGACACATA TGAACCTCTC ATTAGGATGC 2669  
 AGGAGAAGAC CCAAGCCACA GATATGTATC TGAAGAATGA ACAAGATTCT TAGGCCCGGC 2729

ACGGTGGCTC ACATCTGTAA TCTCAAGAGT TTGAGAGGTC AAGGCAGGCA GATCACCTGA 2789  
 GGTCAGGAGT TCAAGACCAG CCTGGCCAAC ATGATGAAAC CCTGCCTCTA CTAAAAATAC 2849  
 AAAAATTAGC AGGGCATGGT GGTGCATGCC TGCAACCCCTA GCTACTCAGG AGGCTGAGAC 2909  
 AGGAGAACATCT CTTGAACCCCT CGAGGCAGGAG GTTGTGGTGA GCTGAGATCC CTCTACTGCA 2969  
 CTCCAGCCTG GGTGACAGAG ATGAGACTCC GTCCCTGCCG CCGCCCCCGC CTTCCCCCCC 3029  
 AAAAAGATTG TTCTTCATGC AGAACATAAG GCAGTCACAA AAGGGAGACC TGGGTCCAGG 3089  
 TGTCCAAGTC ACTTATTCG AGTAAATTAG CAATGAAAGA ATGCCATGGA ATCCCTGCC 3149  
 AAATACCTCT GCTTATGATA TTGTAGAATT TGATATAGAG TTGTATCCA TTTAAGGAGT 3209  
 AGGATGTAGT AGGAAAGTAC TAAAAACAAA CACACAAACA GAAAACCCCTC TTTGCTTTGT 3269  
 AAGGTGGTTC CTAAGATAAT GTCAGTGCAA TGCTGGAAAT AATATTAAT ATGTGAAGGT 3329  
 TTTAGGCTGT GTTTCCCT CCTGTTCTT TTTCTGCCA GCCCTTGTC ATTTTGCAAG 3389  
 GTCAATGAAT CATGTAGAAA GAGACAGGAG ATGAAACTAG AACCAACTCCA TTTTGCCCC 3449  
 TTTTTATT TCTGGTTTG GTAAAAGATA CAATGAGGTA GGAGGTTGAG ATTTATAAAT 3509  
 GAAGTTAAT AAGTTCTGT AGCTTGATT TTTCTCTTC ATATTGTTA TCTTGCAAA 3569  
 GCCAGAATTG GCCTGTAAAA TCTACATATG GATATTGAAG TCTAAATCTG TTCAACTAGC 3629  
 TTACACTAGA TGGAGATATT TTCATATTCA GATAACTGG AATGTATGAT CTAGCCATGC 3689  
 GTAATATACT CAAGTGTGAAAGGTATT TTTTAATAG CGTCTTAGT TGTGGACTGG 3749  
 TTCAAGTTT TCTGCCAATG ATTTCTCAA ATTTATCAA TATTTTCCA TCATGAAGTA 3809  
 AAATGCCCTT GCAGTCACCC TTCTGAAGT TTGAACGACT CTGCTGTTT AAACAGTTA 3869  
 AGCAAATGGT ATATCATCTT CCGTTTACTA TGTAGCTAA CTGCAGGCTT ACGTTTGAA 3929  
 GTCAGCGGCC AACTTTATTG CCACCTCAA AAGTTTATTA TAATGTTGTA AATTTTACT 3989  
 TCTCAAGGTT AGCATACTTA GGAGTTGCTT CACAATTAGG ATTCAAGGAAA GAAAGAACTT 4049  
 CAGTAGGAAC TGATTGGAAT TTAATGATGC AGCATTCAAT GGGTACTAAT TTCAAAAGAAT 4109  
 GATATTACAG CAGACACACA GCAGTTATCT TGATTTCTA GGAATAATTG TATGAAGAAT 4169  
 ATGGCTGACA ACACGGCCTT ACTGCCACTC AGCGGAGGCT GGACTAATGA ACACCCCTACC 4229  
 CTTCTTCCT TTCTCTCAC ATTTCATGAG CGTTTGAG GTAACGAGAA AATTGACTTG 4289  
 CATTGCAATT ACAAGGAGGA GAAACTGGCA AAGGGGATGA TGGTGGAAAGT TTTGTTCTGT 4349  
 CTAATGAAGT GAAAAATGAA AATGCTAGAG TTTGTGCAA CATAATAGTA GCAGTAAAAA 4409  
 CCAAGTGAAA AGTCTTCCA AAACTGTGTT AAGAGGGCAT CTGCTGGAA ACGATTGAG 4469

GAGAAGGTAC TAAATTGCTT GGTATTTCC GTAG GA ACC CCA GAG CGA AAT ACA 4523

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr

115

GTT TGC AAA AGA TGT CCA GAT GGG TTC TTC TCA AAT GAG ACG TCA TCT 4571

Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser

120

125

130

135

AAA GCA CCC TGT AGA AAA CAC ACA AAT TGC AGT GTC TTT GGT CTC CTG 4619

Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu

140

145

150

CTA ACT CAG AAA GGA AAT GCA ACA CAC GAC AAC ATA TGT TCC GGA AAC 4667

Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn

155

160

165

AGT GAA TCA ACT CAA AAA TGT GGA ATA G GTAATTACAT TCCAAAATAC 4715

Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys Gly Ile

170

175

GTCTTGAC GATTTGTAG TATCATCTCT CTCTCTGAGT TGAACACAAG GCCTCCAGCC 4775

ACATTCTTGG TCAAACCTAC ATTTTCCCTT TCTTGAATCT TAACCAGCTA AGGCTACTCT 4835

CGATGCATTA CTGCTAAAGC TACCACTCAG AATCTCTCAA AAACTCATCT TCTCACAGAT 4895

AACACCTCAA AGCTTGATT TCTCTCCTT CACACTGAAA TCAAATCTG CCCATAGGCA 4955

AAGGGCAGTG TCAAGTTGCA CACTGAGATG AAATTAGGAG AGTCCAAACT GTAGAATTCA 5015

CGTTGTGTGT TATTACTTTC ACAGAACATCTCT GTATTATTAA CTAAAGTATA TATTGGCAAC 5075

TAAGAAGCAA AGTGATATAA ACATGATGAC AAATTAGGCC AGGCATGGTG GCTTACTCCT 5135

ATAATCCCAA CATTGGGG GGCCAGGTAA GGCAAGTCAC TTGAGGTCAG GATTCAAGA 5195

CCAGCCTGAC CAACATGGTG AAACCTTGTC TCTACTAAAA ATACAAAAAT TAGCTGGCA 5255

TGGTAGCAGG CACTTCTAGT ACCAGCTACT CAGGGCTGAG GCAGGAGAAT CGCTTGAACC 5315  
 CAGGAGATGG AGGTTGCAGT GAGCTGAGAT TGTACCACTG CACTCCAGTC TGGGCAACAG 5375  
 AGCAAGATT CATCACACAC ACACACACAC ACACACACAC ACACATTAGA AATGTGTACT 5435  
 TGGCTTGTT ACCTATGGTA TTAGTGCATC TATTGCATGG AACTTCCAAG CTACTCTGGT 5495  
 TGTGTTAACG TCTTCATTGG GTACAGGTCA CTAGTATTAA GTTCAGGTTA TTCGGATGCA 5555  
 TTCCACGGTA GTGATGACAA TTCATCAGGC TAGTGTGTGT GTTCACCTTG TCACTCCCAC 5615  
 CACTAGACTA ATCTCAGACC TTCACTCAAA GACACATTAC ACTAAAGATG ATTTGCTTT 5675  
 TTGTGTTAA TCAAGCAATG GTATAAACCA GCTTGACTCT CCCCAAACAG TTTTCGTAC 5735  
 TACAAAGAAG TTTATGAAGC AGAGAAATGT GAATTGATAT ATATATGAGA TTCTAACCCA 5795  
 GTTCCAGCAT TGTTTCATTG TGTAATTGAA ATCATAGACA AGCCATTAA GCCTTGCTT 5855  
 TCTTATCTAA AAAAAAAA AAAAAAATGA AGGAAGGGT ATTAAAAGGA GTGATCAAAT 5915  
 TTTAACATTC TCTTAATTA ATTCACTTTT AATTTTACTT TTTTCATT ATTGTGCACT 5975  
 TACTATGTGG TACTGTGCTA TAGAGGCTTT AACATTTATA AAAACACTGT GAAAGTTGCT 6035  
 TCAGATGAAT ATAGGTAGTA GAACGGCAGA ACTAGTATTG AAAGCCAGGT CTGATGAATC 6095  
 CAAAAACAAA CACCCATTAC TCCCATTTC TGGGACATAC TTACTCTACC CAGATGCTCT 6155  
 GGGCTTGTA ATGCCATGT AAATAACATA GTTTATGTT TGTTTATT CCTATGTAAT 6215  
 GTCTACTTAT ATATCTGTAT CTATCTCTG CTTGTTTCC AAAGGTAAAC TATGTGTCTA 6275  
 AATGTGGCA AAAAATAACA CACTATTCCA AATTACTGTT CAAATTCTT TAAGTCAGTG 6335  
 ATAATTATTG GTTTGACAT TAATCATGAA GTTCCCTGTG GGTACTAGGT AAACCTTAA 6395  
 TAGAATGTTA ATGTTGTAT TCATTATAAG AATTTTGGC TGTTACTTAT TTACAACAAT 6455  
 ATTTCACTCT AATTAGACAT TTACTAACT TTCTCTTGAA AACAAATGCCC AAAAAAGAAC 6515  
 ATTAGAAGAC ACGTAAGCTC AGTTGGTCTC TGCCACTAAG ACCAGCCAAC AGAAGCTTGA 6575  
 TTTTATTCAA ACTTTCATT TTAGCATATT TTATCTTGAA AAATTCAATT GTGTTGGTTT 6635  
 TTGTTTTTG TTTGTATTGA ATAGACTCTC AGAAATCCAA TTGTTGAGTA AATCTCTGG 6695  
 GTTTCTAAC CTTCTTTAG AT GTT ACC CTG TGT GAG GAG GCA TTC TTC AGG 6747

Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg

180

185

TTT GCT GTT CCT ACA AAG TTT ACG CCT AAC TGG CTT AGT GTC TTG GTA 6795

Phe Ala Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val

190 195 200

GAC AAT TTG CCT GGC ACC AAA GTA AAC GCA GAG AGT GTA GAG AGG ATA 6843  
Asp Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile

205 210 215

AAA CGG CAA CAC AGC TCA CAA GAA CAG ACT TTC CAG CTG CTG AAG TTA 6891  
Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu

220 225 230 235

TGG AAA CAT CAA AAC AAA GAC CAA GAT ATA GTC AAG AAG ATC ATC CAA G 6940  
Trp Lys His Gln Asn Lys Asp Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile Ile Gln

240 245 250

GTATGATAAT CTAAAATAAA AAGATCAATC AGAAATCAA GACACCTATT TATCATAAAC 7000  
CAGGAACAAG ACTGCATGTA TGTAGTTG TGTGGATCTT GTTCCCTGT TGGAATCATT 7060  
GTTGGACTGA AAAAGTTCC ACCTGATAAT GTAGATGTGA TTCCACAAAC AGTTATACAA 7120  
GGTTTGTTTC TCACCCCTGC TCCCCAGTTT CCTTGTAAAG TATGTTGAAC ACTCTAAGAG 7180  
AAGAGAAATG CATTGAAGG CAGGGCTGTA TCTCAGGGAG TCGCTTCCAG ATCCCTTAAC 7240  
GCTTCTGTAAGCAGCCCCCTC TAGACCACCA AGGAGAAGCT CTATAACCAC TTTGTATCTT 7300  
ACATTGCACC TCTACCAAGA AGCTCTGTTG TATTTACTTG GTAATTCTCT CCAGGTAGGC 7360  
TTTTCGTAGC TTACAAATAT GTTCTTATTA ATCCTCATGA TATGCCCTGC ATTAAAATTA 7420  
TTTTAATGGC ATATGTTATG AGAATTAATG AGATAAAATC TGAAAAGTGT TTGAGCCTCT 7480  
TGTAGGAAAA AGCTAGTTAC AGCAAAATGT TCTCACATCT TATAAGTTA TATAAGATT 7540  
CTCCTTCTAGA AATGGTGTGA GAGAGAAACA GAGAGAGATA GGGAGAGAAG TGTGAAAGAA 7600  
TCTGAAGAAA AGGAGTTCA TCCAGTGTGG ACTGTAAGCT TTACGACACA TGATGGAAAG 7660  
AGTTCTGACT TCAGTAAGCA TTGGGAGGAC ATGCTAGAAG AAAAAGGAAG AAGAGTTCC 7720  
ATAATGCAGA CAGGGTCAGT GAGAAATTCA TTCAGGTCCT CACCACTAGT TAAATGACTG 7780

TATAGTCTTG CACTACCCCTA AAAAACCTCA AGTATCTGAA ACCGGGGCAA CAGATTTAG 7840  
 GAGACCAACG TCTTGAGAG CTGATTGCTT TTGCTTATGC AAAGAGTAAA CTTTTATGTT 7900  
 TTGAGCAAAC CAAAAGTATT CTTTGAACGT ATAATTAGCC CTGAAGCCGA AAGAAAAGAG 7960  
 AAAATCAGAG ACCGTTAGAA TTGGAAGCAA CCAAATTCCC TATTTATAA ATGAGGACAT 8020  
 TTTAACCCAG AAAGATGAAC CGATTGGCT TAGGGCTCAC AGATACTAAG TGACTCATGT 8080  
 CATTAATAGA AATGTTAGTT CCTCCCTCTT AGGTTTGAC CCTAGCTTAT TACTGAAATA 8140  
 TTCTCTAGGC TGTGTGTCTC CTTTAGTTCC TCGACCTCAT GTCTTGAGT TTTCAGATAT 8200  
 CCTCCTCATG GAGGTAGTCC TCTGGTGCTA TGTGTATTCT TTAAAGGCTA GTTACGGCAA 8260  
 TTAACTTATC AACTAGCGCC TACTAATGAA ACTTTGTATT ACAAAAGTAGC TAACTTGAAT 8320  
 ACTTTCTTT TTTTCTGAAA TGTTATGGTG GTAATTCTC AAACTTTTTC TTAGAAAAGT 8380  
 GAGAGTGATG TGTCTTATT TCTACTGTTA ATTTCAAAA TTAGGAGCTT CTTCCAAAGT 8440  
 TTTGTTGGAT GCCAAAAATA TATAGCATAT TATCTTATTA TAACAAAAAA TATTTATCTC 8500  
 AGTTCTTAGA AATAAAATGGT GTCACTAAC TCCCTCTCAA AAGAAAAGGT TATCATTGAA 8560  
 ATATAATTAT GAAATTCTGC AAGAACCTTT TGCCTCACGC TTGTTTATG ATGGCATTGG 8620  
 ATGAATATAA ATGATGTGAA CACTTATCTG GGCTTTGCT TTATGCAG AT ATT GAC 8676

Asp Ile Asp

CTC TGT GAA AAC AGC GTG CAG CGG CAC ATT GGA CAT GCT AAC CTC ACC	8724		
<b>Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala Asn Leu Thr</b>			
255	260	265	270

TTC GAG CAG CTT CGT AGC TTG ATG GAA AGC TTA CCG GGA AAG AAA GTG	8772		
<b>Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val</b>			
275	280	285	

GGA GCA GAA GAC ATT GAA AAA ACA ATA AAG GCA TGC AAA CCC AGT GAC	8820		
<b>Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp</b>			
290	295	300	

CAG ATC CTG AAG CTG CTC AGT TTG TGG CGA ATA AAA AAT GGC GAC CAA 8868  
**Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln**

305 310 315

GAC ACC TTG AAG GGC CTA ATG CAC GCA CTA AAG CAC TCA AAG ACG TAC 8916  
**Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr**

320 325 330

CAC TTT CCC AAA ACT GTC ACT CAG AGT CTA AAG AAG ACC ATC AGG TTC 8964  
**His Phe Pro Lys Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile Arg Phe**  
 335 340 345 350

CTT CAC AGC TTC ACA ATG TAC AAA TTG TAT CAG AAG TTA TTT TTA GAA 9012  
**Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu**  
 355 360 365

ATG ATA GGT AAC CAG GTC CAA TCA GTA AAA ATA AGC TGC TTA 9054  
**Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu**  
 370 375 380

TAACCTGGAAA TGGCCATTGA GCTGTTTCCT CACAATTGGC GAGATCCCAT GGATGAGTAA 9114  
 ACTGTTTCTC AGGCACATTGA GGCTTTCACT GATATCTTC TCATTACCAAG TGACTAATT 9174  
 TGCCACAGGG TACTAAAAGA AACTATGATG TGGAGAAAGG ACTAACATCT CCTCCAATAA 9234  
 ACCCAAATG GTTAATCCAA CTGTCAGATC TGGATCGTTA TCTACTGACT ATATTTCCC 9294  
 TTATTACTGC TTGCAGTAAT TCAACTGGAA ATTAAAAAAA AAAAAGTAGA CTCCACTGGG 9354  
 CCTTACTAAA TATGGGAATG TCTAACTTAA ATAGCTTG GATTCCAGCT ATGCTAGAGG 9414  
 CTTTTATTAG AAAGCCATAT TTTTTCTGT AAAAGTTACT AATATATCTG TAACACTATT 9474  
 ACAGTATTGC TATTATATT CATTAGATA TAAGATTGG ACATATTATC ATCCTATAAA 9534  
 GAAACGGTAT GACTTAATT TAGAAAGAAA ATTATATTCT GTTTATTATG ACAAAATGAAA 9594

GAGAAAATAT ATATTTTAA TGGAAAGTTT GTAGCATTCTAATAGGT ACTGCCATAT 9654  
 TTTCTGTGT GGAGTATTAA TATAATTAA TCTGTATAAG CTGTAATATC ATTTTATAGA 9714  
 AAATGCATTA TTTAGTCAT TGTTAACAT TGAAAACAT ATGAAATATA AATTATCTGA 9774  
 ATATTAGATG CTCTGAGAAA TTGAATGTAC CTTATTTAAA AGATTTATG GTTTTATAAC 9834  
 TATATAAAATG ACATTATTAA AGTTTCAAA TTATTTTTA TTGCTTCTC TGTTGCTTT 9894  
 ATTT 9898

## 【0026】

配列番号：3

配列の長さ：401

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

配列：

Met Asn Asn Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser		
-20	-15	-10
Ile Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His		
-5	1	5
Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro		
10	15	20
Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr		
25	30	35
Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr Tyr Asp Ser Trp His		
40	45	50
Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu		
55	60	65
Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys		
70	75	80

Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys  
 85 90 95  
 His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala Gly Thr  
 100 105 110  
 Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe Phe  
 115 120 125  
 Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn  
 130 135 140  
 Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr  
 145 150 155  
 His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys  
 160 165 170  
 Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala  
 175 180 185  
 Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp  
 190 195 200  
 Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile  
 205 210 215  
 Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys  
 220 225 230  
 Leu Trp Lys His Gln Asn Lys Asp Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile  
 235 240 245  
 Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile  
 250 255 260  
 Gly His Ala Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu  
 265 270 275  
 Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr  
 280 285 290  
 Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser

295	300	305
Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu		
310	315	320
Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys Thr		
325	330	335
Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile Arg Phe Leu His Ser Phe		
340	345	350
Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile Gly		
355	360	365
Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu		
370	375	380

## 【0027】

配列番号：4

配列の長さ：1206

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列：

ATGAAACAAC	TGCTGTGCTG	CGCGCTCGTG	TTTCTGGACA	TCTCCATTAA	GTGGACCACC	60
CAGGAAACGT	TTCCTCCAAA	GTACCTTCAT	TATGACGAAG	AAACCTCTCA	TCAGCTGTTG	120
TGTGACAAAT	GTCCTCCTGG	TACCTACCTA	AAACAACACT	GTACAGCAAA	GTGGAAGACC	180
GTGTGCGCCC	CTTGCCCTGA	CCACTACTAC	ACAGACAGCT	GGCACACCCAG	TGACGAGTGT	240
CTATACTGCA	GCCCCGTGTG	CAAGGAGCTG	CAGTACGTCA	AGCAGGAGTG	CAATCGCACC	300
CACAACCGCG	TGTGCGAATG	CAAGGAAGGG	CGCTACCTTG	AGATAGAGTT	CTGCTTGAAA	360
CATAGGAGCT	GCCCTCCTGG	ATTTGGAGTG	GTGCAAGCTG	GAACCCCAGA	GCGAAATACA	420
GTGGCAAAA	GATGTCCAGA	TGGGTTCTTC	TCAAATGAGA	CGTCATCTAA	AGCACCCCTGT	480
AGAAAACACA	CAAATTGCAG	TGTCTTGGT	CTCCTGCTAA	CTCAGAAAGG	AAATGCAACA	540

CACGACAACA TATGTTCCGG AAACAGTGAA TCAACTCAA AATGTGGAAT AGATGTTACC 600  
CTGTGTGAGG AGGCATTCTT CAGGTTGCT GTTCCTACAA AGTTTACGCC TAACTGGCTT 660  
AGTGTCTTGG TAGACAATTT GCCTGGCACC AAAGTAAACG CAGAGAGTGT AGAGAGGATA 720  
AACACGGCAAC ACAGCTCACA AGAACAGACT TTCCAGCTGC TGAAGTTATG GAAACATCAA 780  
AACAAAGACC AAGATATAGT CAAGAAGATC ATCCAAGATA TTGACCTCTG TGAAAACAGC 840  
GTGCAGCGGC ACATTGGACA TGCTAACCTC ACCTTCGAGC AGCTTCGTAG CTTGATGGAA 900  
AGCTTACCGG GAAAGAAAGT GGGAGCAGAA GACATTGAAA AAACAATAAA GGCATGCAA 960  
CCCAGTGACC AGATCCTGAA GCTGCTCAGT TTGTGGCGAA TAAAAAATGG CGACCAAGAC 1020  
ACCTTGAAGG GCCTAATGCA CGCACTAAAG CACTCAAAGA CGTACCACTT TCCCAAAACT 1080  
GTCACTCAGA GTCTAAAGAA GACCATCAGG TTCCCTTCACA GCTTCACAAT GTACAAATTG 1140  
TATCAGAAGT TATTTTTAGA AATGATAGGT AACCCAGGTCC AATCAGTAAA AATAAGCTGC 1200  
TTATAA 1206

【図面の簡単な説明】

【図1】

実施例3(iii)における、本発明ゲノムDNAを発現して得られた蛋白質の、ウエスタンプロットティングの結果を示す。

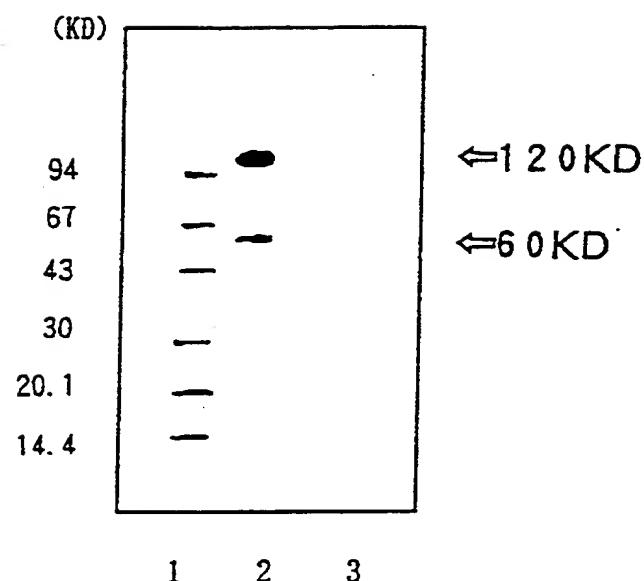
【符号の説明】

- 1 : マーカー
- 2 : ベクターpWESR  $\alpha$  OCIFをトランスフェクトした COS7 細胞培養上清（実施例3(iii)）
- 3 : ベクターpWESR  $\alpha$  をトランスフェクトした COS7 細胞培養上清（対照）

【書類名】

図面

【図1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 破骨細胞形成抑制作用を有する蛋白質をコードする新規D N A 及びそれを用いる該蛋白質の製造法。

【解決手段】 配列表1及び2で示されるD N A。

該D N Aを発現ベクターに挿入し、遺伝子工学的手法によって分子量約 60kD (還元条件下) の約60kD及び約 120kD (非還元条件下) の破骨細胞形成抑制作用を有する蛋白質を製造する方法。

この蛋白質は、破骨細胞形成抑制作用を有し、骨粗鬆症、リウマチ症の治療に有用である。

【選択図】 なし

## INTENATIONAL FORM

[特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約]

下記正方形内に記載された規則7.1に従い  
発行される

## 原寄託についての受託証

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF  
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF  
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL  
DEPOSIT

Issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY  
identified at the bottom of this  
page.

氏名(名跡) 雪印乳業株式会社 生物科学研究所  
所長 竹下 保義  
寄託者 殿  
あて名 ㊞ 329-05  
茨城県下都賀郡石岡町大字下石岡字花林  
519番地

I. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) PBK/01F10	(受託番号) FERM BP- 5267
II. 科学的性質及び分類学上の位置	
I番の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
III. 受領及び受託	
本正方形内に記載された文書は、平成 7年 6月21日(原寄託日)に受領したI番の微生物を受託する。	
IV. 多言語の受託	
本正方形内に記載された文書は、平成 7年 6月21日(原寄託日)にI番の微生物を受領した。 そして、平成 7年 10月25日に駒澤大よりブダペスト条約に基づく寄託への多言語請求を受領した。 (平成 7年 6月21日に寄託された駒澤大研磨寄第 P- 14998 号より)	
V. 国際寄託当局	
茨城県立工業技術院生命工学工業技術研究所  National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Natural Science and Technology 所長 大石 達也 Michio OISHI, Ph.D., DIRECTOR GENERAL. あて名: 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号(郵便番号305) 1-3, Higashimachi, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305, JAPAN	

平成 7年(1995)10月 25日

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

## 【特許出願人】

【識別番号】 000006699

【住所又は居所】 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号

【氏名又は名称】 雪印乳業株式会社

## 【代理人】

【識別番号】 100090941

【住所又は居所】 東京都新宿区四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階  
藤野・児玉特許事務所

【氏名又は名称】 藤野 清也

## 【代理人】

【識別番号】 100105061

【住所又は居所】 東京都新宿区四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階  
藤野・児玉特許事務所

【氏名又は名称】 児玉 喜博

## 【提出された物件の記事】

【提出物件名】 原寄託についての受託証 1

出願人履歴情報

識別番号 [000006699]

1. 変更年月日 1990年 8月28日

[変更理由] 新規登録

住 所 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号

氏 名 雪印乳業株式会社